

哈蟆油匀浆水溶液抗疲劳作用研究

蔡悦萍 张贵君 武亚楠 渠磊 郑婧 高晓美 王道君

【摘要】 目的 研究哈蟆油的抗疲劳作用。**方法** 制备 0.5% g/mL 哈蟆油匀浆水溶液,采用小鼠灌胃给药,按成人日摄入量的 1、10、30 倍(即 0.3、3.3、10.0 mL/kgBW)连续灌胃 30 天,与阴性对照组比较,测定负重小鼠游泳后血清尿素、肝糖原和血乳酸的含量。**结果** 10.0 mL/kgBW 剂量组能延长小鼠负重游泳时间,减少小鼠游泳时血清尿素和血乳酸的产生,与阴性对照组比较均有显著性差异($P < 0.05$)。**结论** 成人每天服用 20 mL 的 0.5% g/mL 哈蟆油匀浆水溶液(0.1 g 哈蟆油)有明显的抗疲劳作用。

【关键词】 哈蟆油; 抗疲劳; 血清尿素; 肝糖原; 血乳酸

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.11.016

Study on the anti fatigue effect of oviductus ranae homogenate solution CAI Yue-ping, ZHANG Gui-jun, WU Ya-nan, et al. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Corresponding author: ZHANG Gui-jun, E-mail: guijunzhang@163.com

【Abstract】 Objective To study the anti-fatigue effect of Oviductus Ranae. **Methods** The Oviductus Ranae homogenate solution 0.5% g/mL was prepared, the mice were orally administered the drug into stomach at doses that 1, 10 and 30 times the average adult amount of to adult (0.3, 3.3, 10 mL/kgBW) for 30 days, and then loaded them before determining the level of serum urea, liver glycogen and blood lactic acid. The results between intervention and control groups were then compared. **Results** Mice from 10 mL/kgBW dose group exhibited a prolonged the swimming time, and reduced blood urea nitrogen and blood lactic acid production levels. These differences were statistically significant between intervention the control groups ($P < 0.05$).

Conclusion 0.5% g/mL of Oviductus Ranae homogenate solution serves anti-fatigue effects in mice.

【Key words】 Oviductus Ranae; Anti-fatigue; Serum urea; Glycogen; Blood lactate

中药材哈蟆油(oviductus ranae)为蛙科动物中国林蛙 *Rana temporaria chensinensis* David 雌蛙的输卵管,经采制干燥而得。哈蟆油味甘、咸,性平,具有补肾益精、健脾益胃、滋阴补肾、润肺生津等功效^[1],其药理作用主要有抗疲劳、增强机体免疫力、镇咳祛痰、抗衰老、滋阴养颜、调节血脂、抗缺氧、调节机体免疫功能和应激性及抗焦虑等^[2],对体弱气虚、精力耗损、记忆力不佳、神经衰弱等疗效较好,有滋补“软黄金”的美誉,具有非常高的应用价值。

目前哈蟆油的研究主要是针对其复方及不同剂型的产品,具有一定的局限性^[3]。本文从哈蟆油的药理作用—抗疲劳方面进行研究,考察了较低含量的哈蟆油对小鼠的负重游泳时间、血清尿素氮、肝糖原以及游泳前后血乳酸水平等指标^[4]的影响,为更高效地利用中药材哈蟆油及其产品开发提供一定的理论参考。

1 材料与方法

1.1 供试品

0.5% g/mL 哈蟆油匀浆水溶液,白色乳胶状液体(吉林黄栌花药业有限公司提供)。

1.2 实验动物

ICR 清洁级雄性小鼠,体质量 18~22 g[吉林大学白求恩医学院动物实验中心,SCXK-(吉)2007-0003]。小鼠基础饲料[长春市亿思实验动物饲料厂,生产许可证号:SCXK-(吉)2010-0001]。

作者单位:100102 北京中医药大学中药学院[蔡悦萍(硕士研究生)、张贵君、武亚楠、渠磊、郑婧、高晓美];北京中医药大学第三附属医院药学部(蔡悦萍);吉林黄栌花药业有限公司(王道君)

作者简介:蔡悦萍(1984-),女,2009 级在职硕士研究生。研究方向:中药鉴定方法研究。E-mail:lovingcyp@126.com

通讯作者:张贵君(1954-),本科,教授,博士生导师。研究方向:中药鉴定方法学、中药药效组分及药效组分质量评价体系研究。E-mail: guijunzhang@163.com

1.3 主要仪器与试剂

游泳箱 (50 cm×50 cm×40 cm), 电子天平、铅皮、722 分光光度计、秒表、血乳酸测定

试酶膜 (上海一基实业有限公司)、尿素测定试剂盒 (深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司)、肝糖原试剂盒 (南京市建成生物工程研究所)、TBA-120FR 型全自动生化分析仪 (日本东芝)、SBA-40C 型生物传感分析仪 (山东省科学院生物研究所)。

1.4 剂量设计

按照成人 (人体质量以 60 kg 计) 每天摄入 20 mL 0.5% g/mL 哈蟆油匀浆水溶液, 即 0.3 mL/kgBW, 按照成人日摄入量的 1、10、30 倍设置日灌胃剂量, 即 0.3、3.3、10.0 mL/kgBW, 分别取 3.3、33.3、100 mL 成品加蒸馏水至 200 mL, 蒸馏水作阴性对照组, 该试验不需设置糖对照组。各组小鼠每天灌胃量均为 0.2 mL/10 gBW, 连续灌胃 30 天。

1.5 实验方法

1.5.1 负重游泳试验 末次给予受试物 30 分钟后, 置小鼠在游泳箱中游泳, 水深约 30 cm, 水温 (25±1)℃, 鼠尾根部负荷 5% 体质量的铅皮。记录小鼠自游泳开始至死亡时间, 作为小鼠游泳时间。

1.5.2 血清尿素测定 末次给予受试物 30 分钟, 在温度为 (30±0.5)℃ 的水中游泳 90 分钟, 休息 60 分钟摘眼球采血。取血清, 进行尿素含量测定。

1.5.3 肝糖原测定 末次给予受试物 30 分钟处死小鼠取肝脏, 经生理盐水漂洗后用滤纸吸干, 精确称取肝脏 75 mg, 每管加入 225 μL 试剂盒提供的碱溶液, 用薄膜封住管口, 扎一透气孔, 沸水浴 20 分钟, 冷却后加入 7.2 mL 蒸馏水, 充分混匀, 按试剂说明书操作加入显色剂, 沸水浴 5 分钟, 用 722 分光光度计在 620 nm 波长进行比色测定, 按说明书提供的公式换算肝糖原。

1.5.4 血乳酸测定 末次给予受试物 30 分钟后采血 20 μL, 再在温度为 (30±0.5)℃ 的水中不负重游泳 10 分钟, 分别于游泳后立即 (游泳后 0 分钟) 和游泳后休息 20 分钟各采血 20 μL, 采用生物传感分析仪测定以上三个时间点的血乳酸值。(溶血剂及测定液均由山东省科学院生物研究所提供)。以上三个时间点的血乳酸曲线下面积 (计算公式见后) 判断结果。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 11.5 统计软件处理, 计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 若数据符合正态分布, 方差齐时, 采用单因素方差进行均值比较, 各组间两两比较用 LSD 法; 方差不齐时, 各组间两两比较用 Tamhane 法。

2 结果

2.1 0.5% g/mL 哈蟆油匀浆水溶液对小鼠负重游泳时间及小鼠增重的影响

由表 1 可见, 经口给予小鼠不同剂量的 0.5% g/mL 哈蟆油匀浆水溶液 30 天, 各实验组小鼠增重与阴性对照组比较无显著性差异 ($P>0.05$), 高剂量组游泳时间长于阴性对照组, 且差异有统计学意义 ($P<0.05$), 说明 0.5% g/mL 哈蟆油匀浆水溶液能延长小鼠负重游泳时间而对小鼠增重无影响。

2.2 0.5% g/mL 哈蟆油匀浆水溶液对小鼠血清尿素及小鼠增重的影响

由表 2 可见, 经口给予小鼠不同剂量的 0.5% g/mL 哈蟆油匀浆水溶液 30 天, 各实验组小鼠增重与阴性对照组比较无显著性差异 ($P>0.05$), 高、中剂量组小鼠游泳后血清尿素低于阴性对照组, 且与阴性对照组比较有显著性差异 ($P<0.05$), 说明 0.5% g/mL 哈蟆油匀浆水溶液具有抑制小鼠游泳后血清尿素升高的作用而对小鼠增重无影响。

表 1 0.5% g/mL 哈蟆油匀浆水溶液对小鼠负重游泳时间及小鼠增重的影响 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 始重 (g) | 终重 (g) | 增重 (g) | 游泳时间 (分钟) |
|----------------|----|----------|----------|----------|------------------------|
| 阴性对照组 | 10 | 19.0±1.0 | 32.9±1.6 | 14.0±1.8 | 379±1.36 |
| 0.3 mL/kgBW 组 | 10 | 19.3±0.7 | 32.9±3.0 | 13.6±3.0 | 3.28±1.33 |
| 3.3 mL/kgBW 组 | 10 | 19.0±0.8 | 34.0±3.4 | 14.9±3.1 | 5.07±2.409 |
| 10.0 mL/kgBW 组 | 10 | 19.3±0.9 | 34.2±2.8 | 14.9±2.5 | 5.56±2.23 ^a |

注: 与阴性对照组比较, $^a P<0.05$ 。

表 2 0.5% g/mL 哈蟆油匀浆水溶液对小鼠游泳后血清尿素及小鼠增重的影响 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 始重 (g) | 终重 (g) | 增重 (g) | 血清尿素 (mmol/L) |
|----------------|----|----------|----------|----------|------------------------|
| 阴性对照组 | 10 | 19.2±1.0 | 33.4±2.0 | 14.1±1.7 | 11.25±1.41 |
| 0.3 mL/kgBW 组 | 10 | 19.1±0.7 | 32.8±3.2 | 13.7±3.1 | 11.19±1.26 |
| 3.3 mL/kgBW 组 | 10 | 19.0±0.8 | 33.9±3.3 | 14.8±3.0 | 9.87±1.62 ^a |
| 10.0 mL/kgBW 组 | 10 | 19.3±0.9 | 33.9±2.5 | 14.6±2.2 | 9.49±1.53 ^a |

注: 与阴性对照组比较, $^a P<0.05$ 。

表 3 0.5% g/mL 哈蟆油匀浆水溶液对小鼠肝糖原含量及小鼠增重的影响($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | n | 始重(g) | 终重(g) | 增重(g) | 肝糖原(mg/g 肝组织) |
|----------------|----|----------|----------|----------|---------------|
| 阴性对照组 | 10 | 19.3±1.0 | 32.9±2.1 | 13.6±1.7 | 35.55±7.41 |
| 0.3 mL/kgBW 组 | 10 | 19.4±0.9 | 32.8±3.1 | 13.4±2.7 | 35.70±11.23 |
| 3.3 mL/kgBW 组 | 10 | 18.8±0.6 | 33.8±2.9 | 15.0±2.4 | 36.40±9.90 |
| 10.0 mL/kgBW 组 | 10 | 19.4±1.2 | 33.3±3.0 | 13.9±2.3 | 37.98±8.20 |

表 4 给予 0.5% g/mL 哈蟆油匀浆水溶液小鼠游泳前、后及休息 20 分钟三个时间点血乳酸值($\bar{x}\pm s$, mmol/L)

| 组别 | n | 游泳前(mmol/L) | 游泳后 0 分钟 | 游泳后休息 20 分钟 |
|----------------|----|-------------|-----------|-------------|
| 阴性对照组 | 10 | 2.85±0.75 | 6.30±1.09 | 3.21±0.80 |
| 0.3 mL/kgBW 组 | 10 | 2.85±0.76 | 6.00±1.17 | 2.94±0.83 |
| 3.3 mL/kgBW 组 | 10 | 2.85±0.86 | 4.86±1.21 | 3.39±0.55 |
| 10.0 mL/kgBW 组 | 10 | 2.82±0.74 | 4.65±0.65 | 3.12±0.47 |

表 5 0.5% g/mL 哈蟆油匀浆水溶液对小鼠三个时间点血乳酸曲线下面积及小鼠增重的影响($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | n | 始重(g) | 终重(g) | 增重(g) | 三个时间点血乳酸曲线下面积(mmol/L) |
|----------------|----|----------|----------|----------|-------------------------|
| 阴性对照组 | 10 | 19.4±1.1 | 33.3±2.5 | 13.9±2.5 | 140.9±25.6 |
| 0.3 mL/kgBW 组 | 10 | 19.4±1.0 | 32.9±3.2 | 13.5±3.0 | 133.7±25.7 |
| 3.3 mL/kgBW 组 | 10 | 18.9±0.7 | 33.8±3.4 | 14.9±2.9 | 121.1±26.3 |
| 10.0 mL/kgBW 组 | 10 | 19.5±1.0 | 33.5±2.3 | 14.1±2.1 | 115.1±15.1 ^a |

注：与阴性对照组比较，^a $P<0.05$ 。

2.3 0.5% g/mL 哈蟆油匀浆水溶液对小鼠肝糖原含量及小鼠增重的影响

由表 3 可见，经口给予小鼠不同剂量的 0.5% g/mL 哈蟆油匀浆水溶液 30 天，各实验组小鼠增重与阴性对照组比较无显著性差异($P>0.05$)，各剂量肝糖原含量与对照组相比未见显著性差异($P>0.05$)，说明 0.5% g/mL 哈蟆油匀浆水溶液对增加肝糖原储备及小鼠增重未见影响。

肝糖原 = $\frac{\text{测定管 OD 值}}{\text{标准管 OD 值}} \times 0.01 (\text{标准液葡萄糖浓度})$
 $\times \text{测定前稀释倍数} (100 \times 10) \times 1.11$

2.4 0.5% g/mL 哈蟆油匀浆水溶液对小鼠血乳酸值及小鼠体重的影响

三个时间点血乳酸曲线下面积 = $5 \times (\text{游泳前血乳酸值} + 3 \times \text{游泳后 0 分钟血乳酸值} + 2 \times \text{游泳后休息 20 分钟血乳酸值})$

由表 5 可见，经口给予小鼠不同剂量的 0.5% g/mL 哈蟆油匀浆水溶液 30 天，各实验组小鼠增重与阴性对照组比较无显著性差异($P>0.05$)，各实验组乳酸曲线下面积与阴性对照组相比均有减小，其中高剂量组小鼠游泳后三个时间点血乳酸曲线下面积有所降低，且与阴性对照组比较，差异有统计学意义($P<0.05$)，说明 0.5% g/mL 哈蟆油匀浆水溶液能够抑制游泳时血乳酸的产生而对小鼠增重无影响。

3 讨论

本实验灌胃给予小鼠 0.5% g/mL 哈蟆油匀浆水溶液，连续灌胃 30 天，10.0 mL/kgBW 剂量组能

延长小鼠负重游泳时间，减少小鼠游泳时血清尿素的产生，减少血乳酸的产生；3.3 mL/kgBW 剂量组能减少小鼠游泳时血清尿素的产生，与阴性对照组比较，差异有统计学意义($P<0.05$)，即 0.5% g/mL 哈蟆油匀浆水溶液有缓解体力疲劳作用。

本研究采用的负重游泳实验是评价抗运动性疲劳的重要指标。另外许多研究认为，体力性疲劳的产生与运动机体的能量消耗、代谢物堆积和内环境变化等因素密切相关，故本研究针对这几方面确定了抗疲劳的评价指标，即肝糖原的储备、血乳酸水平及血清尿素含量^[5]。通过分析研究结果可知，成人每天服用 20 mL 的 0.5% g/mL 哈蟆油匀浆水溶液(0.1 g 哈蟆油)有较明显的抗疲劳保健功能，这为临床上更高效地利用中药材哈蟆油及其保健产品的开发提供了科学依据。

参 考 文 献

[1] 常乐,刘汶,张琳.哈蟆油的研究进展[J].沈阳药科大学学报,2011,28(5):350-409.
[2] 刘郁,刘连新.林蛙油的成分及药理研究进展[J].海峡药学,2007,19(12):1-3.
[3] 王涵,赵雨,张梅.哈蟆油降血脂、耐缺氧和抗疲劳的功能研究[J].食品研究与开发,2012,33(8):201-203.
[4] 张梅,赵雨,杨士慧.哈蟆油抗疲劳药理活性研究[J].现代预防医学,2012,39(8):1978-1979.
[5] 李津明,宋茜,孙仁爽.林蛙油酶解前后抗疲劳作用对比研究[J].黑龙江医药,2008,21(2):30-34.

(收稿日期: 2015-08-12)
(本文编辑: 董历华)